



Research
Tissue Engineering—Review

人类诱导性多能干细胞稳定生产的最新进展

Ikki Horiguchi*, Masahiro Kino-oka

Department of Biotechnology, Graduate School of Engineering, Osaka University, Osaka 565-0871, Japan

ARTICLE INFO

Article history:

Received 13 March 2019

Revised 10 May 2020

Accepted 30 June 2020

Available online 14 January 2021

关键词

诱导性多能干细胞

细胞生产

扩增

灌装

冻存

摘要

诱导性多能干细胞 (iPSC) 在许多方面, 如再生医学和药物筛选方面, 是理想的细胞来源, 其开发前景广阔。但是, 目前还没有一种有效的大规模生产系统来确保诱导性多能干细胞的稳定供应。本文综述了近年来为了实现诱导性多能干细胞的稳定生产所采取的方法。本文首先讨论了诱导性多能干细胞培养过程中需要控制的因素, 如养分供应、废物清除和氧气供应。然后, 介绍了基于黏附、悬浮和支架的诱导性多能干细胞培养系统的最新研究。本文还讨论了细胞培养阶段之后进行的过程, 如灌装和冻存过程, 由于细胞悬浮液在超低温保存培养基中存活率降低, 所以其生产规模受到了限制。最后, 我们总结了实现诱导性多能干细胞稳定生产的可能性, 并强调了仍有待克服的局限性。本文表明为了获得最佳且稳定的大规模生产诱导性多能干细胞系统, 运用多学科研究手段对研究影响细胞生长和质量的复杂因素是至关重要的。

© 2021 THE AUTHORS. Published by Elsevier LTD on behalf of Chinese Academy of Engineering and Higher Education Press Limited Company This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

1. 引言

自2006年有关诱导性多能干细胞 (iPSC) 产生的初步报告[1,2]以来, iPSC已成为再生医学[3–6]、药物筛选[6,7]和食品工业[8]领域中具有良好前景的细胞来源。由于其强大的增殖和分化能力, 与胚胎干细胞 (ESC) 类似, 它们能够作为体内各种细胞类型的可再生来源。此外, 由于培育它们不需要使用胚胎, 因而不存在伦理问题, 且它们的自体移植也不会引起与免疫相关的并发症。伴随着高度的期望, 有关iPSC的科学研究在其产生后的10年中迅速发展。

临床或工业相关的iPSC应用需要大量细胞, 而稳定的大规模生产iPSC的方法目前正处于发展阶段。例如,

胰岛移植需要每个患者至少 6×10^8 个 β 细胞, 而其产生需要大约 0.6 m^2 的培养表面[9], 这等同于80个 75 cm^2 大小的培养皿。在极端情况下, 制备30%的肝组织需要每个患者 6×10^{10} 个肝细胞; 这些细胞需从 60 m^2 的培养区获得, 等于8000个这样的培养皿。此外, 考虑到分化过程的因素, 所需的细胞数量将达到上述的两倍以上。根据细胞治疗成本估算研究, 假设的批次规模约为每批次 $1 \times 10^{10} \sim 1 \times 10^{11}$ 个细胞, 等于每批次100~10 000管瓶[10–12]。这些要求不能通过实验室常规黏附培养 (包括手工操作) 来实现。因此, 有必要开发一个稳定的iPSC制造过程。

各种培养系统都已经被研发至可以产生大量细胞的阶段。基于细胞的大规模生产系统传统上是为细胞衍生

* Corresponding author.

E-mail address: horiguchi@bio.eng.osaka-u.ac.jp (I. Horiguchi).

物开发的，如染料、疫苗和抗体[13]。使用不同的方法对于细胞治疗应用是必不可少的，因为细胞本身就是产品。虽然iPSC是贴壁依赖性细胞，但它们也可以通过团聚体的形式在悬浮液中培养。因此，可以使用两种不同的培养体系培养iPSC：黏附培养和悬浮培养。此外，目前正在开发基于支架的方法控制干细胞龕以及稳定iPSC质量。

在大规模生产过程中，细胞灌装和冻存的下游过程对于开发稳定的iPSC生产系统具有重要意义。由于细胞质量会在生产过程中随时间而变化，所以立即灌装和冻存对于稳定生产至关重要。一种用于细胞治疗的高通量灌装和冻存系统仍在开发中；因此，缺乏一个合适的下游过程限制了目前的生产规模。虽然下游过程还没有发展到像上游过程那样得到广泛的报道，但作为扩大细胞生产的限制因素，人们已意识到其重要性。

在本文中，我们从上游和下游过程两方面总结了稳定的iPSC大规模生产系统的研究和发展。首先，我们讨论了iPSC培养中的一般限制因素，如养分供应、废物排除和生长因子的存在。关于上游过程，我们介绍了黏附培养、悬浮培养和支架培养系统的特点和发展。然

后，我们讨论了限制iPSC生产规模扩大化的一个因素：下游过程。最后，我们总结了稳定的iPSC生产的最新进展，并提出了为再生医学等新的工业领域开发稳定生产系统时所涉及的问题。

2. iPSC 培养中的限制因素

2.1. 养分的供应和废物的清除

由于iPSC主要依靠糖酵解来满足其能量需求[14–17]，所以葡萄糖饲养方式对iPSC培养具有重要意义。一些研究报告显示，在培养基中保持高葡萄糖浓度可以增强iPSC中多能标记物的增殖和表达[18,19]。这些增强效果的机理尚不清楚；然而，一些报告表明，葡萄糖诱导的高渗透压对其起着重要作用[19,20]。此外，一些报告提到，谷氨酰胺氧化对人体PSC的生存也至关重要[21]。谷氨酰胺代谢不仅有助于核苷酸和谷胱甘肽的合成，而且有助于通过氧化磷酸化促进三磷酸腺苷(ATP)的产生。在葡萄糖消耗的过程中，谷氨酰胺进行氧化，为三羧酸(TCA)循环产生ATP。基于这些研究，iPSC的生产需要葡萄糖和谷氨酰胺的控制，两者的稳定

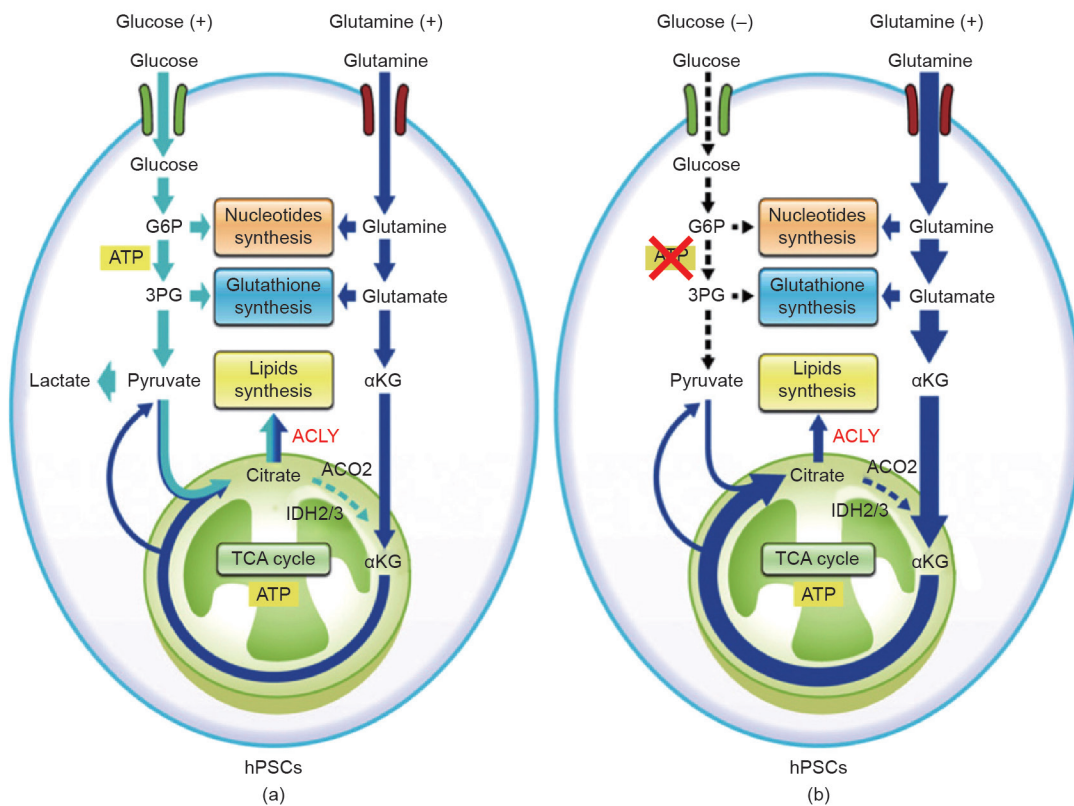


图1. 在葡萄糖存在 (a) 和葡萄糖耗尽 (b) 的情况下，人类多能干细胞 (hPSC) 中的葡萄糖和谷氨酰胺代谢的示意图。ACO2: 乌头酸酶2; IDH2/3: 异柠檬酸脱氢酶2/3基因; α KG: α -酮戊二酸; G6P: 葡萄糖-6-磷酸; 3PG: 3-磷酸甘油醛; ACLY: ATP-柠檬酸裂解酶。转载自参考文献[21]，经Elsevier公司许可，©2016。

供应对于稳定生产iPSC十分重要（图1 [21]）。

在培养过程中，大量的乳酸作为糖酵解的产物，降低了培养基的pH值，导致iPSC的死亡。此外，先前的研究表明，即使在培养过程中控制pH值，乳酸也会降低iPSC的增长率[18]。

这些报告表明，及时供应葡萄糖和去除乳酸对iPSC的成功培养至关重要。以前的研究也表明，连续供应葡萄糖提升了iPSC的增长率和多能性[22,23]。特别是利用透析系统有效且持续地输送营养物质和排除废物，能够保持较好的养分浓度和废物浓度[23]。然而，这种系统需要额外的设备，因而也需要更多的空间和一系列复杂的操作。因此，在利用该系统进行细胞培养时需要满足上述要求。

2.2. 氧气供应

氧气对细胞培养至关重要，尤其是在大规模和高密度的培养过程中。一些关于二维平面培养的报道明确指出，在透氧膜上进行培养可以形成多层组织并改善细胞功能[24–26]。然而，在三维培养中，由于内部细胞会因缺乏氧气而发生坏死，组织厚度受到氧气扩散的限制[27]。

如第2.1节所述，iPSC通过糖酵解产生其所需的能量，而这一过程不需要氧气。因此，低氧浓度（<10%）是维持iPSC的最佳方法，同时也可以阻止iPSC分化[28,29]。然而，氧气耗竭（<1%）会延迟iPSC的增殖[29]。因此，将氧浓度保持在3%~10%之间，对于生产质量、数量稳定的iPSC至关重要。大多数的iPSC培养中，氧气是由培养基的顶部提供的，也有一些研究采取了通过透氧膜补充氧气，如封闭系统[30,31]。喷射也是一种有效的供氧方法，然而在iPSC培养过程中，气泡引起的介质流动会影响iPSC的存活率，所以目前很少使用喷射方式。

2.3. 其他添加物

添加生长因子等对于控制细胞的生长、维持和分化过程十分重要，这同样适用于iPSC培养。Rho依赖性蛋白激酶（ROCK）抑制剂，如Y-27632和thiazovivin，在人iPSC的培养中具有重要作用。在过去，如果人体iPSC分裂成单细胞，它们就无法存活，因此，对人体iPSC进行传代时，细胞应该以小团为基本单位。人体iPSC的传代是非常困难的，需要专门的技术。先前的一项研究表明，单独分离出来的人体iPSC的死亡是ROCK

依赖性细胞凋亡引起的[32]。近来，ROCK抑制剂的加入明显提高了传代后的细胞存活率，简化了传代过程。除了提高传代后的存活率外，ROCK抑制剂对iPSC还有其他作用：提高冷冻保存的效率，支持未分化生长，增强分化[33]。因此，ROCK抑制剂在各种情况下都对人体iPSC的稳定生产有帮助。

碱性成纤维细胞生长因子（bFGF）是人体iPSC的多能性和自我更新所必需的成分[34–36]，因此它通常被添加到iPSC培养基中。然而，由于bFGF缺乏热稳定性，需要频繁地更换介质，增加了大规模生产的成本[37]。现在已有几种方法可以减少补充bFGF所需介质的频率，如持续释放bFGF和提高bFGF的热稳定性[37–39]。

转化生长因子- β （TGF- β ）超家族蛋白质，如TGF- β 蛋白、激活素、nodal和骨形成蛋白（BMP），在维持iPSC的多能性方面也可以发挥重要作用。TGF- β 1已被证明有助于维持人iPSC的多能性[40,41]。Nodal和激活素A激活相同的受体和信号，抑制人iPSC分化，维持其多能性。然而，高浓度的激活素A（约 $100 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ ）也促进了人体iPSC向中外胚层细胞的分化[41,42]。因此，活性素A浓度应保持在 $50 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 以下，以保持人iPSC的多能性。BMP4属于TGF- β 超家族，其能够维持小鼠iPSC的多能性，但会诱导人体iPSC的分化[43,44]。BMP4可从细胞中分泌，且可以在血清替代培养基中检测到。拮抗剂头蛋白（Noggin）与bFGF协同作用，抑制BMP4的分化诱导，且维持其多能性[35]。

最后，研究人员报道了包括培养基、基质和解离方法等多种因素[45]，能够影响单代培养和多代培养中的细胞特征[46]。正如第5节中所提到的，这些影响稳定生产的因素仍然是需要解决的问题。

3. 扩增过程

目前开发的iPSC大规模生产系统基于两种典型的培养体系：黏附培养和悬浮培养。还有一个系统是基于支架的系统，它既包含黏附培养系统，也包含悬浮系统。

3.1. 黏附培养系统

黏附培养是在实验室中培养哺乳动物细胞的一种传统方法。在传统的黏附培养中，细胞被接种到含有饲养细胞（如小鼠胚胎成纤维细胞）的基质上，这会导致

细胞的交叉污染。近年来,为了实现无饲养iPSC培养,各种细胞外基质(ECM)涂层被研发了出来。ECM应该包含一种精氨酸-甘氨酸-天冬氨酸(RGD)基序,如基质胶、层粘连蛋白或玻璃粘连蛋白,因为iPSC的细胞-基质黏附性主要由整联蛋白控制[47]。最早使用动物性的ECM,如基质胶。然而,为了确保生物安全,最近已经开发出了包含ECM分子片段的非动物ECM,如层粘连蛋白-511片段[48,49]和玻璃粘连蛋白片段[50]。

为了通过黏附培养来进行大规模生产,人们需要一个大的培养表面。因此,能够增加容器中的培养表面积的方法(如叠板)是提高生产力的重要途径[51,52]。然而,控制培养表面较大的容器很难,所以在不能使用微载体时,扩大培养表面是备用选择。

自动化培养操作是提高生产力和确保质量稳定的另一种方法[53–58]。世界各地的许多公司都已经开发出了机械化的培养系统,其中包括补料和清除废物杂质的导管以及处理实验设备(如培养容器、移液管和导管)的机械臂。稳定运行以及并行生产的可能性是机械化系统的主要优势。已经有报道证实了通过灵活培养平台进行并行操作的可能性[58]。然而,尽管硬件开发取得了进步,但用于优化操作和监控细胞质量的软件应用程序仍在开发中。细胞培养的操作过程随细胞类型的不同而变化,因此人们需要了解各种操作对细胞培养结果的影响和优化培养,以确保黏附培养的稳定生产。

黏附培养的一个优点是容易观察细胞形态。在iPSC培养中,包括维持过程和分化过程,人们每天需要根据细胞形态确定细胞状态。因此,监测iPSC菌落的形态是检验其质量和稳定性的有效方法。这些形态学的测定是由经验丰富的专家进行的。这类专家在形态测定方面的技能和知识取决于操作员的经验,且很难培训其他人员达到类似的专业水平。目前正在开发基于图像的iPSC质量评估分析[59–61]。最近,深度学习研究已经应用于黏附培养中的基于图像的iPSC质量控制中[62,63]。这些方法试图不使用免疫染色等常规的生物质量检查来评估iPSC和iPSC衍生细胞的质量,这种方法需要技能,而且会因抗体等试剂的质量波动而导致测试结果的不稳定。虽然建立一个可靠的工具需要成千上万的图像信息,但这些技术是监测iPSC生产质量和稳定性的有力工具。

总之,黏附培养是一种常规的细胞培养方法,可以利用实验室实验的知识和经验来保证iPSC的最佳产量。虽然这种培养系统的可扩展性有限,但使用机械化生产

系统进行并行生产可以克服这一障碍。为了通过自动化系统实现稳定的大规模生产,需要研究每一步操作过程,包括运输、管道输送、离心和接种等对细胞特性的影响。为了了解这些操作的影响,需要了解有关机械信号转导为机械力的生物学研究[64,65]。此外,还需了解利用化学工程提取影响细胞质量的关键参数以设计自动培养操作系统。

3.2. 悬浮培养系统

悬浮培养已被开发为细菌[66]、植物[67]和动物细胞的扩增培养系统,并用于生产各种生物产品,如发酵食品、药物以及细胞本身。与黏附培养不同,悬浮培养不需要黏附表面,因此能够使用更简单且易于扩增的容器。一些研究报道了悬浮培养能够用于iPSC和ESC扩增[66–73]和分化[71–74]。

由于iPSC的形成需要附着,所以它们在悬浮培养物中形成团聚体。由于养分和氧气在团聚体中的转移存在限制[27,75]以及与细胞系有关的ECM积累等各种因素,团聚体的尺寸有限。先前的研究表明,一些细胞系形成了具有壳状结构的ECM,其包裹细胞并阻止细胞生长[76,77]。报告还显示,缺乏ECM会导致细胞死亡和不稳定的聚集生长[78]。因此,在设计悬浮培养系统之前,应考虑iPSC系的特性。

由于这些限制,在iPSC悬浮培养过程中,团聚控制是非常重要的,特别是在早期形成较少的团聚体会导致较低的生长情况时[76]。因此,一个理想的方案是产生许多大小可控的团聚体,且使其细胞间有足够的接触,能稳定生长。有人提出了在悬浮培养的早期阶段控制团聚的策略。一种应用较多的策略是使用微孔板制备均匀团聚体[79]。其他可能的建议包括修改培养基[81]或培养皿[31],以限制细胞团聚。此外,通过在培养后期添加降解细胞间接触分子,其将大团聚体分解为小团聚体,能够有效改善iPSC生长率[30,81,82]。

由于iPSC不需要很高的氧气供应量,所以用于iPSC扩增的生物反应器不需要强烈的搅拌,这一点与传统的微生物生物反应器不同。但这并不意味着iPSC的生物反应器完全不需要搅拌。iPSC在悬浮培养中形成团聚物,它很容易沉淀和积聚在生物反应器的底部,因此需要通过搅拌来防止上述问题。另一方面,在悬浮培养过程中进行搅拌,细胞会受到介质流动产生的剪切应力,这种剪切应力影响iPSC的存活[71]和分化[88]。因此,能够在生物反应器中防止沉淀同时也防止造成细胞

损伤的最佳搅拌水平对生物反应器的成功悬浮培养十分重要。在设计用于iPSC悬浮培养的生物反应器时，需估计细胞受到的剪切应力。由于细胞上的剪切应力难以直接测量，因此建议使用计算流体力学来估计剪切应力[89–91]。这些基于计算科学的方法有助于理解剪切应力对iPSC的影响，从而开发出iPSC悬浮培养的最佳生物反应器。

目前已为iPSC悬浮培养开发了各种生物反应器。应用最多的iPSC悬浮培养系统是转瓶系统，这一系统已经得到广泛研究[69,70,71,73,74]。在传统的转瓶系统中，搅拌器进行搅拌，以实现高水平的氧传递，其搅拌速率很高（即约大于 $100 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ ）[66]。相反，在培养iPSC时应尽量减少搅拌（即保持在大约 $60 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 以下），以确保细胞以最小的剪切应力漂浮，因为iPSC不需要高水平的氧传递。在转瓶中，培养基被直接搅拌，能够形成良好的混合，然而搅拌器产生的剪切应力会导致细胞损伤。一个研究小组研究了振动培养系统[31,72,83]。在振动培养中，振动容器间接搅拌培养基。由于没有搅拌器，在振动系统中，细胞的剪切应力比在转瓶中低。此外，振动系统的培养皿更简单，能够实现大规模生产，且易创建一个封闭的系统来保持无菌条件。在振动培养中，由于搅拌能力较弱，iPSC聚集体倾向于沉积到容器底部，因此还需要进一步的设计来防止这种沉降。与振动容器系统类似，旋转壁式容器可以实现微重力培养[84]。以往的研究表明，旋转壁式容器产生的微重力增强了细胞的存活率、增殖能力和分化效率[85,86]。微重力培养系统的一个极端情况——双向旋转容器系统实现了伪零重力[87]。如上所述，生物反应器有各种各样的类型，须根据培养的目的（即扩增或分化）和规模进行选择。

3.3. 利用支架进行培养

第三种培养系统涉及在微载体和微胶囊等支架上进行培养。微载体能够提供比传统黏附培养更大的黏附表面，并广泛用于大规模生产黏附依赖性细胞（如间充质干细胞）。由于iPSC也是黏附依赖性的，因此已有试验使用基于微载体的培养系统大规模生产和分化iPSC[88,92–94]。与静态黏附培养物中的细胞不同，微载体上的细胞悬浮在搅拌容器中，并受到剪切应力，这会影 响细胞的存活和分化（第3.2节）。此外，在扩增后收集细胞时，需要从细胞悬浮液中分离微载体，这一过程会

限制培养的规模。

微载体的选择对于在微载体上成功培养iPSC非常重要。根据以往的研究，尺寸、涂层和表面电荷是影响iPSC扩增的重要因素[92]。根据参考文献[92]，使用小型微载体（小于 $100 \mu\text{m}$ ）会导致低细胞产率。此外，iPSC几乎不附着或生长在表面带有负电荷的微载体上，因此需要一个带正电荷的表面，如胺共轭。ECM涂层可以改善微载体上的细胞生长。参考文献[92]显示，基质胶和层粘连蛋白涂层可以有效地改善细胞生长。为了解决与微载体分离的问题，人们最近开发了经过酶处理可溶解的新型微载体[94]，通过在扩增后浸提微载体，可以跳过分离过程。

微胶囊化是另一种基于支架的iPSC的培养方法，它可以通过生物打印保护细胞免受剪切应力、控制团聚并制备更好的结构[95]。一些报告表明，封装可以防止分化并保持iPSC的多能性[96,97]。此外，还可以对微胶囊进行改性，以控制干细胞龛[98]。虽然这些优势表明iPSC有大批量稳定生产的可能性，但在培养后从胶囊中收集iPSC也阻碍了这种基于支架的生产过程的应用。

最近已经研究了各种封装材料，如聚乙二醇(PEG)、琼脂糖[99]和透明质酸[100]。应用最多的封装材料是海藻酸钠水凝胶。当藻酸盐被滴落到二价阳离子溶液中（如钙、钡和铁离子的溶液）时，它会立即形成水凝胶。因此，通过将含有海藻酸钠溶液的细胞悬浮液滴落到二价阳离子溶液中，可以很容易地实现细胞封装。此外，通过将胶囊浸泡在螯合剂[如乙二胺四乙酸(EDTA)和柠檬酸]或海藻酸钠裂解酶溶液中，很容易就能浸提海藻酸钠水凝胶。由于海藻酸钠水凝胶胶囊表面具有负电荷，作为对胶囊的进一步处理，通过将水凝胶胶囊浸泡在聚-L-赖氨酸和壳聚糖等聚阳离子中，海藻酸钠水凝胶可以被聚离子复合膜覆盖。在形成聚离子复合物后，可以通过将包覆的胶囊浸泡在螯合溶液中来制备具有液体芯的空心胶囊[96,97]。先前的研究报告说，仅用海藻酸盐对多能干细胞(PSC)进行简单封装，会导致细胞从胶囊中渗漏，并在胶囊外生长，因此形成多离子复合膜对胶囊中PSC的扩增至关重要[96,97,101]。

4. 灌装和冻存过程

在iPSC培养过程中除了考虑iPSC生产过程的上游

部分外, 还须考虑遵循扩增过程的下游过程。这些下游过程(包括灌装和冻存过程)对于包装扩增的细胞都是至关重要的。

4.1. 冻存前(灌装)

在灌装过程中, 将0.5~2.0 mL含有冷冻保护剂的细胞悬浮液分配到小瓶中是一项耗时的任务, 因为冷冻培养基的毒性能够影响iPSC在冷冻后的质量和存活率。基于这个问题, 灌装规模受到了限制, 这样从培养系统转移到灌装系统的整个灌装过程可以在1 h内完成。考虑到传统的手工灌装过程的时间限制, 扩增规模估计约为1~5 L, 每批可产生 $1 \times 10^9 \sim 1 \times 10^{10}$ 个细胞。这意味着需要用到几千到一万个小瓶来灌装同一批的细胞悬浮液。在灌装过程中, 细胞随时间衰变, 这导致同一批次内产生了不可忽视的质量差异。先前的一份报告表明, 1 h是确保iPSC在冷冻保存介质中具有最大存活能力的最佳时间[102]。因此, 为了获得所需的批量规模, 开发高通量灌装过程和并行生产系统必不可少。这一限制主要是由于冷冻保存介质中的二甲亚砜(DMSO)引起的。据报道, DMSO会引起蛋白质团聚[104], 并损害线粒体的完整性和膜电位[104]。在iPSC和ESC冷冻保存的情况下, 接触DMSO会降低其多能基因[105,106], 并促进分化标志[106]。因此, 一种无DMSO的冷冻保存方法被研发出来。以往的研究表明, 乙二醇是DMSO的一种替代品, 因其具有较低的毒性和较高的玻璃化效率[107,108]。此外, 由乙二醇、蔗糖和羧化聚-L-赖氨酸组成的冷冻介质已被证明可以通过抑制冰结晶来提高缓慢玻璃化后的细胞存活率[109]。

4.2. 冻存(降温)

冻存是细胞生产所涉及的关键操作之一。传统上, iPSC是通过玻璃化的方式冻存的, 即在高导热容器如ops中用液氮立即冷冻。该技术开发用于保存牛卵和胚胎, 并用于保存PSC。玻璃化作用可以防止在冻存过程中损伤细胞形成的晶体。这是一种成功的方法, 并已在实验室规模中实现了高回收率(在75%以上, 缓慢冷却的回收率为5%~10%)。然而, 用于玻璃化的冷冻保存介质通常具有高浓度的低温保护剂, 如DMSO和乙二醇, 从而使介质具有较高的渗透性和毒性。因此, 快速解冻对于玻璃化细胞样品的成功回收具有重要意义。快速解冻是通过将玻璃化的细胞样品浸入预热的培养基中实现的。虽然玻璃化是在实验室中广泛

使用的一种成功的方法, 但它在PSC的稳定大规模生产中仍有一定的局限性, 如难以控制温度、由于直接接触液氮而造成的污染等。先前的一份报告建议设计一种带有可拆卸式螺丝帽的培养板, 以通过玻璃化法储存黏附的人ESC, 这可能有助于开发用以处理大量细胞的自动化系统[110]。

虽然在过去的实验中, 缓慢冷冻表现出较差的性能[111], 但冷冻保存介质的发展[112,113]以及用缓慢冷却系统进行冻存的方法的进步[114]提高了这些系统的性能及相关的细胞产率。如果用于缓慢冷却的速度太快, 会导致细胞内冰晶的形成。这些细胞内冰晶会破坏细胞器和细胞膜, 并在解冻和重新接种期间导致细胞损伤和死亡[115,116]。另一方面, 冻结太慢会由于渗透压而导致细胞内失水[115,116], 从而导致细胞脱水和收缩, 导致细胞器、质膜和细胞骨架的破坏, 最终导致细胞死亡。因此, 在缓慢冷却系统中, 冷却速度应该慢到能够防止细胞间结冰, 但又快到能够防止细胞内失水。报告指出的最佳冷却速率为 $0.5 \sim 1.0 \text{ K} \cdot \text{min}^{-1}$ [114,116,117]。在缓慢冷却法中, 温度被控制并逐渐降低到最终温度(低于 $-80 \text{ }^\circ\text{C}$) [118]。在这一过程中, 一个编程的深度冷冻机被用于缓慢冷却, 同时记录了各种温度控制程序。当进行大规模冻存时, 就需要一个简单的冷却程序在批量冷却中控制许用温度。这种方法对于大规模可行, 但是可接受的温度差异(即过程的温度稳健性)尚不清楚。缺乏温度稳健性将影响冷冻过程的增容性, 因为大规模会导致热传导的温度变化。

目前正在开发一种深度超冷方法作为另一种使用快速冷却的方法[119,120]。与传统的冷冻保存相比, 这种方法中的细胞会在较高的温度下保存而不进行冻存。这种方法的困难之处是保持过冷水的解冻状态, 因为它很容易受到各种刺激而形成冰晶。最近的一项研究表明, 用不互溶的液体密封表面可以提高稳定性, 并使研究人员能够在 $-10 \sim -7 \text{ }^\circ\text{C}$ 中将人体红细胞储存100 d [120]。经过进一步的开发, 该方法将有望成为储存细胞的候选方法。

总之, 下游过程仍然是扩大iPSC生产的潜在瓶颈, 必须开发新的方法来优化下游过程。为此, 有必要研究各种条件对细胞存活率和质量的影响, 如冷冻保存介质中的悬浮时间和温差。

4.3. 冻存后(储存、运输、解冻)

冻存后, 冷冻细胞悬浮液通常用液氮(液相约

-196 °C，气相约-170 °C) 储存在冷冻储存罐中。低于-130 °C 的温度是理想的长期细胞储存温度，这是因为在低于-130 °C 的温度下不存在液态自由水，而且晶体或玻璃态具有足够高的黏度，能够防止扩散的影响，并完全停止生物时间。虽然许多细胞系能够在-90 ~ -70 °C 的温度下保存数月或数年，但在这种情况下，细胞的生物学时间并没有停止，只是变慢。因此，影响细胞存活率和特征的生物反应仍然会发生，这些影响将会不断积累。先前的一项研究表明，肝细胞在-80 °C 储存时的存活率较低，但在-170 °C 的条件下可维持一年[121]。在细胞生产过程中，温度会随着各种操作而产生波动，如在从冷冻室运输到储存室的过程中等。此外，冷冻细胞样品的运输方法仍在发展中。先前的研究报告，储存过程中的重复温度波动降低了细胞解冻后的存活率[122]。运输过程中容器的温度波动和加速度对冷冻细胞的影响尚不清楚。因此，有必要了解冷冻细胞质量对这些波动的稳健性，以便开发一个稳定的冷冻保存系统。

此外，目前还没有开发出运输冷冻细胞的有效方法。除了适当的热管理之外，运输振动对冷冻细胞的影响仍然不清楚，需被考虑在内。通过了解冷冻细胞对温度变化和力的稳健性，可以实现细胞产品的稳定运输。

解冻细胞是另一个影响细胞质量的关键操作。传统上讲，在37 °C 快速解冻细胞并避免过热对于细胞的成功恢复来说十分重要[116]。因为缓慢融化会因冰晶体变形而导致细胞损伤。虽然人们已经进行了一些解冻工作，但为了获得稳定和成功的结果，还需要进一步了解加热细胞时发生的衰变，并优化这一过程。

5. 未来展望——阻碍稳定生产的问题

如前文所述，有必要开发一个从扩增过程到灌装和冷冻过程的可扩展过程。尽管人们已经在实验室规模下 iPSC 进行了大量试验，但 iPSC 的稳定大规模生产仍在发展中。大规模生产面临的主要阻碍之一，是 iPSC 生产中的复杂操作与手动执行。由于手动处理的波动，可能导致细胞质量的波动。此外，如第2.3节所述，在培养过程中细胞特征在培养过程中随着时间发生突变[46,123]。最近的分析表明，细胞的特征（包括基因表达和药物反应）在实验室之间具有广泛的异质性，即使在同一个细胞株内也是如此[124,125]。与抗体等细胞产品的生产不同，这种异质性不容忽视且应被最小化，因为 iPSC 生

产过程中的产物是细胞本身。为了避免这种异质性，必须建立一种适当的质量控制方法，其中包括开发评估方法和建立适当评估参数。

同时，还有必要开发一个可重复的生产过程。正如第3.1节所提到的，自动化是实现培养操作高重现性从而稳定生产的理想方法。虽然各个行业都开发了自动化的培养系统，但从手工处理到自动化处理的操作转换仍在研发当中。这种发展需要了解细胞培养中的关键操作和参数。化学工程知识有助于开发自动化细胞培养系统等过程。在化学工程方面，各种参数已被用于优化细胞的生产过程。例如，雷诺数（惯性力与黏性力的比值）用来预测不同流动条件下的流动模式。在为 iPSC 开发一个稳定的生产过程时，这些参数有助于在实际执行操作之前预测操作的结果。在最近的一项研究中，一个专门研究运输现象的小组证明，弗劳德数（流动惯性离心力和物体重力的比值）可以用来预测接种过程中振动后细胞的异质性[126]。这些参数设计和性能指标对于开发稳定生产 iPSC 的方法是必要的。

如第3.1节所述，在质量控制方面，预计将开发包括深度学习在内的生物分析和统计策略。深度学习在生物信息学、计算生物学和医学应用等各个领域正在迅速发展[127,128]。这些分析可以在不造成细胞破坏的情况下实现质量检查，并允许通过显微镜的延时捕捉进行实时监控。然而，这种分析往往也是“黑匣子”模型，因此生物实验提供的帮助对于建立有效的深度学习系统非常重要。

iPSC 的稳定大规模生产研发中面临的另一个困难是操作以间接的方式影响细胞。例如，在通过移液分离细胞的过程中，移液操作可以用流量来定义，然而这种操作以剪切应力的形式影响着细胞。换句话说，在操作过程中可以调整的参数和实际影响细胞的参数是不同的。因此，进一步研究如何将操作参数转化为实际影响细胞的参数对于开发稳定的大规模生产过程极为重要。这种研究不仅涉及生物学，还涉及各种工程领域，如力学、流体力学和计算工程。

6. 结论

在本文中，我们讨论了 iPSC 生产中上游过程（如扩增）和下游过程（如灌装和冻存）的发展及其在发展中面临的困难。我们介绍了黏附、悬浮和基于支架的培养系统的优缺点，并讨论了下游过程可能是 iPSC 大规模

生产的瓶颈。虽然人们对iPSC已经研究了几十年，但iPSC尚未实现工业化生产。为了确保稳定的iPSC生产，必须研究生产过程，以确定细胞质量的评估因素，了解在操作过程中影响细胞质量的因素，并了解这些潜在影响机制。对于这些研究而言，有必要从生物学、机械工程、物理和计算工程等角度设计实验来研究iPSC的生产。上述问题不仅适用于iPSC的生产，而且也适用于其他常见的细胞产品的生产，如同质干细胞。因此，解决这些问题的工程方法也将有助于稳定生产包括再生组织和人造肉在内的各种细胞产品。

Acknowledgements

This research was supported by Japan Agency for Medical Research and Development (AMED; JP20be0604001).

Compliance with ethics guidelines

Ikki Horiguchi and Masahiro Kino-oka declare that they have no conflict of interest or financial conflicts to disclose.

References

- [1] Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 2006;126(4):663–76.
- [2] Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K, et al. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* 2007;131(5):861–72.
- [3] Uto S, Nishizawa S, Hikita A, Takato T, Hoshi K. Application of induced pluripotent stem cells for cartilage regeneration in CLAWN miniature pig osteochondral replacement model. *Regen Ther* 2018;9:58–70.
- [4] Rezania A, Bruin JE, Arora P, Rubin A, Batushansky I, Asadi A, et al. Reversal of diabetes with insulin-producing cells derived in vitro from human pluripotent stem cells. *Nat Biotechnol* 2014;32(11):1121–33.
- [5] Bertolotti E, Neri A, Camparini M, Macaluso C, Marigo V. Stem cells as source for retinal pigment epithelium transplantation. *Prog Retin Eye Res* 2014;42:130–44.
- [6] Hartman ME, Dai DF, Laflamme MA. Human pluripotent stem cells: prospects and challenges as a source of cardiomyocytes for in vitro modeling and cell-based cardiac repair. *Adv Drug Deliver Rev* 2016;96:3–17.
- [7] Farkhondeh A, Li R, Gorshkov K, Chen KG, Might M, Rodems S, et al. Induced pluripotent stem cells for neural drug discovery. *Drug Discov Today* 2019;24(4):992–9.
- [8] Post MJ. Cultured meat from stem cells: challenges and prospects. *Meat Sci* 2012;92(3):297–301.
- [9] Zweigerdt R. Large scale production of stem cells and their derivatives. In: Martin U, editor. *Engineering of stem cells. Advances in biochemical engineering/biotechnology*. Berlin: Springer; 2009. p. 201–35.
- [10] Hassan S, Simaria AS, Varadaraju H, Gupta S, Warren K, Farid SS. Allogeneic cell therapy bioprocess economics and optimization: downstream processing decisions. *Regen Med* 2015;10(5):591–609.
- [11] Simaria AS, Hassan S, Varadaraju H, Rowley J, Warren K, Vanek P, et al. Allogeneic cell therapy bioprocess economics and optimization: single-use cell expansion technologies. *Biotechnol Bioeng* 2014;111(1):69–83.
- [12] Li Y, Ma T. Bioprocessing of cryopreservation for large-scale banking of human pluripotent stem cells. *BioRes Open Access* 2012;1(5):205–14.
- [13] Raven N, Rasche S, Kuehn C, Anderlei T, Klöckner W, Schuster F, et al. Scaled-up manufacturing of recombinant antibodies produced by plant cells in a 200-L orbitally-shaken disposable bioreactor. *Biotechnol Bioeng* 2015;112(2):308–21.
- [14] Varum S, Rodrigues AS, Moura MB, Momcilovic O, Easley CA, Ramalho-Santos J, et al. Energy metabolism in human pluripotent stem cells and their differentiated counterparts. *PLoS ONE* 2011;6(6):e20914.
- [15] Panopoulos AD, Yanes O, Ruiz S, Kida YS, Diep D, Tautenhahn R, et al. The metabolome of induced pluripotent stem cells reveals metabolic changes occurring in somatic cell reprogramming. *Cell Res* 2012;22(1):168–77.
- [16] Lees JG, Gardner DK, Harvey AJ. Pluripotent stem cell metabolism and mitochondria: beyond ATP. *Stem Cells Int* 2017;2017(6):2874283.
- [17] Folmes CDL, Dzeja PP, Nelson TJ, Terzic A. Metabolic plasticity in stem cell homeostasis and differentiation. *Cell Stem Cell* 2012;11(5):596–606.
- [18] Horiguchi I, Urabe Y, Kimura K, Sakai Y. Effects of glucose, lactate and basic FGF as limiting factors on the expansion of human induced pluripotent stem cells. *J Biosci Bioeng* 2018;125(1):111–5.
- [19] Madonna R, Geng YJ, Shelat H, Ferdinandy P, De Caterina R. High glucose-induced hyperosmolarity impacts proliferation, cytoskeleton remodeling and migration of human induced pluripotent stem cells via aquaporin-1. *Biochim Biophys Acta* 2014;1842(11):2266–75.
- [20] Chaudhry MA, Bowen BD, Piret JM. Culture pH and osmolality influence proliferation and embryoid body yields of murine embryonic stem cells. *Biochem Eng J* 2009;45(2):126–35.
- [21] Tohyama S, Fujita J, Hishiki T, Matsuura T, Hattori F, Ohno R, et al. Glutamine oxidation is indispensable for survival of human pluripotent stem cells. *Cell Metab* 2016;23(4):663–74.
- [22] Kropp C, Kempf H, Halloin C, Robles-Diaz D, Franke A, Scheper T, et al. Impact of feeding strategies on the scalable expansion of human pluripotent stem cells in single-use stirred tank bioreactors. *Stem Cell Transl Med* 2016;5(10):1289–301.
- [23] Nath SC, Nagamori E, Horie M, Kino-Oka M. Culture medium refinement by dialysis for the expansion of human induced pluripotent stem cells in suspension culture. *Bioproc Biosyst Eng* 2017;40(1):123–31.
- [24] Hamon M, Hanada S, Fujii T, Sakai Y. Direct oxygen supply with polydimethylsiloxane (PDMS) membranes induces a spontaneous organization of thick heterogeneous liver tissues from rat fetal liver cells in vitro. *Cell Transplant* 2012;21(2–3):401–10.
- [25] Evenou F, Fujii T, Sakai Y. Spontaneous formation of stably-attached and 3D organized hepatocyte aggregates on oxygen-permeable polydimethylsiloxane membranes having 3D microstructures. *Biomed Microdevices* 2010;12(3):465–75.
- [26] Xiao W, Shinohara M, Komori K, Sakai Y, Matsui H, Osada T. The importance of physiological oxygen concentrations in the sandwich culture of rat hepatocytes on gas-permeable membranes. *Biotechnol Prog* 2014;30(6):1401–10.
- [27] Sutherland RM, Sordat B, Bamat J, Gabbert H, Bourrat B, Mueller-Klieser W. Oxygenation and differentiation in multicellular spheroids of human colon carcinoma. *Cancer Res* 1986;46(10):5320–9.
- [28] Kimura K, Horiguchi I, Kido T, Miyajima A, Sakai Y. Enhanced hepatic differentiation of human iPSC cells using gas permeable membrane. *Tissue Eng* 2019;25(5–6):457–67.
- [29] Ezashi T, Das P, Roberts RM. Low O₂ tensions and the prevention of differentiation of hES cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005;102(13):4783–8.
- [30] Otsuji TG, Bin J, Yoshimura A, Tomura M, Tateyama D, Minami I, et al. A 3D sphere culture system containing functional polymers for large-scale human pluripotent stem cell production. *Stem Cell Rep* 2014;2(5):734–45. Erratum in: *Stem Cell Rep* 2014;2(5):746.
- [31] Horiguchi I, Suzuki I, Morimura T, Sakai Y. An orbital shaking culture of mammalian cells in O-shaped vessels to produce uniform aggregates. *J Vis Exp* 2019;143:e57922.
- [32] Ohgushi M, Matsumura M, Eiraku M, Murakami K, Aramaki T, Nishiyama A, et al. Molecular pathway and cell state responsible for dissociation-induced apoptosis in human pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell* 2010;7(2):225–39.
- [33] Kurosawa H. Application of Rho-associated protein kinase (ROCK) inhibitor to human pluripotent stem cells. *J Biosci Bioeng* 2012;114(6):577–81.
- [34] Xu RH, Peck RM, Li DS, Feng X, Ludwig T, Thomson JA. Basic FGF and suppression of BMP signaling sustain undifferentiated proliferation of human ES cells. *Nat Methods* 2005;2(3):185–90.
- [35] Wang G, Zhang H, Zhao Y, Li J, Cai J, Wang P, et al. Noggin and bFGF cooperate to maintain the pluripotency of human embryonic stem cells in the absence of feeder layers. *Biochem Biophys Res Commun* 2005;330(3):934–42.
- [36] Haghghi F, Dahmann J, Nakhaei-Rad S, Lang A, Kutschka I, Zenker M, et al. bFGF-mediated pluripotency maintenance in human induced pluripotent stem cells is associated with NRAS-MAPK signaling. *Cell Commun Signal* 2018;16(1):96.
- [37] Chen G, Gulbranson DR, Yu P, Hou Z, Thomson JA. Thermal stability of fibroblast growth factor protein is a determinant factor in regulating self-renewal, differentiation, and reprogramming in human pluripotent stem cells. *Stem Cells* 2012;30(4):623–30.
- [38] Furue MK, Na J, Jackson JP, Okamoto T, Jones M, Baker D, et al. Heparin promotes the growth of human embryonic stem cells in a defined serum-free medium. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008;105(36):13409–14. Erratum in: *Proc Natl Acad Sci USA* 2008;105(46):18071.
- [39] Lotz S, Goderie S, Tokas N, Hirsch SE, Ahmad F, Corneo B, et al. Sustained levels of FGF2 maintain undifferentiated stem cell cultures with biweekly feeding. *PLoS ONE* 2013;8(2):e56289.
- [40] Amit M, Shariki C, Margulets V, Itskovitz-Eldor J. Feeder layer- and serum-

- free culture of human embryonic stem cells. *Biol Reprod* 2004;70(3):837–45.
- [41] Schuldiner M, Yanuka O, Itskovitz-Eldor J, Melton DA, Benvenisty N. Effects of eight growth factors on the differentiation of cells derived from human embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000;97(21):11307–12.
- [42] Guo S, Mao X, He F, Liu H, Ming L. Activin A supplement in the hESCs culture enhances the endoderm differentiation efficiency. *Cell Biol Int* 2014;38(7):849–56.
- [43] Li Z, Chen YG. Functions of BMP signaling in embryonic stem cell fate determination. *Exp Cell Res* 2013;319(2):113–9.
- [44] Xu RH, Chen X, Li DS, Li R, Addicks GC, Glennon C, et al. BMP4 initiates human embryonic stem cell differentiation to trophoblast. *Nat Biotechnol* 2002;20(12):1261–4.
- [45] Bai Q, Ramirez JM, Becker F, Pantescio V, Lavabre-Bertrand T, Hovatta O, et al. Temporal analysis of genome alterations induced by single-cell passaging in human embryonic stem cells. *Stem Cells Dev* 2015;24(5):653–62.
- [46] Garitaonandia I, Amir H, Boscolo FS, Wambua GK, Schultheisz HL, Sabatini K, et al. Increased risk of genetic and epigenetic instability in human embryonic stem cells associated with specific culture conditions. *PLoS ONE* 2015;10(2):e0118307.
- [47] Rowland TJ, Miller LM, Blaschke AJ, Doss EL, Bonham AJ, Hikita ST, et al. Roles of integrins in human induced pluripotent stem cell growth on Matrigel and vitronectin. *Stem Cells Dev* 2010;19(8):1231–40.
- [48] Miyazaki T, Futaki S, Suemori H, Taniguchi Y, Yamada M, Kawasaki M, et al. Laminin E8 fragments support efficient adhesion and expansion of dissociated human pluripotent stem cells. *Nat Commun* 2012;3(1):1236. Erratum in: *Nat Commun* 2013;4:1931.
- [49] Nakagawa M, Taniguchi Y, Senda S, Takizawa N, Ichisaka T, Asano K, et al. A novel efficient feeder-free culture system for the derivation of human induced pluripotent stem cells. *Sci Rep* 2014;4(1):3594.
- [50] Chen G, Gulbranson DR, Hou Z, Bolin JM, Ruotti V, Probasco MD, et al. Chemically defined conditions for human iPSC derivation and culture. *Nat Methods* 2011;8(5):424–9.
- [51] Titus K, Klimovich V, Rothenberg M, Pardo P, Tanner A, Martin G. Closed system cell culture protocol using HYPERStack vessels with gas permeable material technology. *J Vis Exp* 2010;45:e2499.
- [52] Abraham EJ, Slater KA, Sanyal S, Linehan K, Flaherty PM, Qian S. Scale-up of mammalian cell culture using a new multilayered flask. *J Vis Exp* 2011;58:e3418.
- [53] Archibald PRT, Chandra A, Thomas D, Chose O, Massouridès E, Laâbi Y, et al. Comparability of automated human induced pluripotent stem cell culture: a pilot study. *Bioproc Biosyst Eng* 2016;39(12):1847–58.
- [54] Ball O, Robinson S, Bure K, Brindley DA, McCall D. Bioprocessing automation in cell therapy manufacturing: outcomes of special interest group automation workshop. *Cytotherapy* 2018;20(4):592–9.
- [55] Crombie DE, Daniszewski M, Liang HH, Kulkarni T, Li F, Lidgerwood GE, et al. Development of a modular automated system for maintenance and differentiation of adherent human pluripotent stem cells. *SLAS Discov* 2017;22(8):1016–25.
- [56] Soares FAC, Chandra A, Thomas RJ, Pedersen RA, Vallier L, Williams DJ. Investigating the feasibility of scale up and automation of human induced pluripotent stem cells cultured in aggregates in feeder free conditions. *J Biotechnol* 2014;173:53–8.
- [57] Thomas RJ, Anderson D, Chandra A, Smith NM, Young LE, Williams D, et al. Automated, scalable culture of human embryonic stem cells in feeder-free conditions. *Biotechnol Bioeng* 2009;102(6):1636–44.
- [58] Kikuchi T, Kino-Oka M, Wada M, Kobayashi T, Kato M, Takeda S, et al. A novel, flexible and automated manufacturing facility for cell-based health care products: Tissue Factory. *Regen Ther* 2018;9:89–99.
- [59] Kato R, Matsumoto M, Sasaki H, Joto R, Okada M, Ikeda Y, et al. Parametric analysis of colony morphology of non-labelled live human pluripotent stem cells for cell quality control. *Sci Rep* 2016;6(1):34009.
- [60] Nagasaka R, Matsumoto M, Okada M, Sasaki H, Kanie K, Kii H, et al. Visualization of morphological categories of colonies for monitoring of effect on induced pluripotent stem cell culture status. *Regen Ther* 2017;6:41–51.
- [61] Nagasaka R, Gotou Y, Yoshida K, Kanie K, Shimizu K, Honda H, et al. Imagebased cell quality evaluation to detect irregularities under same culture process of human induced pluripotent stem cells. *J Biosci Bioeng* 2017;123(5):642–50.
- [62] Orita K, Sawada K, Koyama R, Ikegaya Y. Deep learning-based quality control of cultured human-induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes. *J Pharmacol Sci* 2019;140(4):313–6.
- [63] Zhang H, Shao X, Peng Y, Teng Y, Saravanan KM, Zhang H, et al. A novel machine learning based approach for iPSC progenitor cell identification. *PLoS Comput Biol* 2019;15(12):e1007351.
- [64] Olson EN, Nordheim A. Linking actin dynamics and gene transcription to drive cellular motile functions. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2010;11(5):353–65.
- [65] Halder G, Dupont S, Piccolo S. Transduction of mechanical and cytoskeletal cues by YAP and TAZ. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2012;13(9):591–600.
- [66] Okano K, Uematsu G, Hama S, Tanaka T, Noda H, Kondo A, et al. Metabolic engineering of *Lactobacillus plantarum* for direct L-lactic acid production from raw corn starch. *Biotechnol J* 2018;13(5):e1700517.
- [67] Kieran PM, MacLoughlin PF, Malone DM. Plant cell suspension cultures: some engineering considerations. *J Biotechnol* 1997;59(1–2):39–52.
- [68] Olmer R, Lange A, Selzer S, Kasper C, Haverich A, Martin U, et al. Suspension culture of human pluripotent stem cells in controlled, stirred bioreactors. *Tissue Eng Part C Methods* 2012;18(10):772–84.
- [69] Ismadi MZ, Gupta P, Fouras A, Verma P, Jadhav S, Bellare J, et al. Flow characterization of a spinner flask for induced pluripotent stem cell culture application. *PLoS ONE* 2014;9(10):e106493.
- [70] Almutawaa W, Rohani L, Rancourt ED. Expansion of human induced pluripotent stem cells in stirred suspension bioreactors. In: Turksen K, editor. *Bioreactors in stem cell biology. Methods in molecular biology*. New York: Humana Press; 2016. p. 53–61.
- [71] Schroeder M, Niebruegge S, Werner A, Willbold E, Burg M, Ruediger M, et al. Differentiation and lineage selection of mouse embryonic stem cells in a stirred bench scale bioreactor with automated process control. *Biotechnol Bioeng* 2005;92(7):920–33.
- [72] Sargent CY, Berguig GY, Kinney MA, Hiatt LA, Carpenedo RL, Berson RE, et al. Hydrodynamic modulation of embryonic stem cell differentiation by rotary orbital suspension culture. *Biotechnol Bioeng* 2010;105(3):611–26.
- [73] Haraguchi Y, Matsuura K, Shimizu T, Yamato M, Okano T. Simple suspension culture system of human iPSC cells maintaining their pluripotency for cardiac cell sheet engineering. *J Tissue Eng Regen Med* 2015;9(12):1363–75.
- [74] Vosough M, Omidinia E, Kadivar M, Shokrgozar MA, Pournasr B, Aghdami N, et al. Generation of functional hepatocyte-like cells from human pluripotent stem cells in a scalable suspension culture. *Stem Cells Dev* 2013;22(20):2693–705.
- [75] Van Winkle AP, Gates ID, Kallos MS. Mass transfer limitations in embryoid bodies during human embryonic stem cell differentiation. *Cells Tissues Organs* 2012;196(1):34–47.
- [76] Nath SC, Horie M, Nagamori E, Kino-Oka M. Size- and time-dependent growth properties of human induced pluripotent stem cells in the culture of single aggregate. *J Biosci Bioeng* 2017;124(4):469–75.
- [77] Kato Y, Kim MH, Kino-Oka M. Comparison of growth kinetics between static and dynamic cultures of human induced pluripotent stem cells. *J Biosci Bioeng* 2018;125(6):736–40.
- [78] Kim MH, Takeuchi K, Kino-Oka M. Role of cell-secreted extracellular matrix formation in aggregate formation and stability of human induced pluripotent stem cells in suspension culture. *J Biosci Bioeng* 2019;127(3):372–80.
- [79] Ungrin MD, Clarke G, Yin T, Niebrugge S, Nostro MC, Sarangi F, et al. Rational bioprocess design for human pluripotent stem cell expansion and endoderm differentiation based on cellular dynamics. *Biotechnol Bioeng* 2012;109(4):853–66.
- [80] Horiguchi I, Sakai Y. Serum replacement with albumin-associated lipids prevents excess aggregation and enhances growth of induced pluripotent stem cells in suspension culture. *Biotechnol Progr* 2016;32(4):1009–16.
- [81] Son MY, Kim HJ, Kim MJ, Cho YS. Physical passaging of embryoid bodies generated from human pluripotent stem cells. *PLoS ONE* 2011;6(5):e19134.
- [82] Nath SC, Tokura T, Kim MH, Kino-Oka M. Botulinum hemagglutinin-mediated in situ break-up of human induced pluripotent stem cell aggregates for high density suspension culture. *Biotechnol Bioeng* 2018;115(4):910–20.
- [83] Nurhayati RW, Ojima Y, Dohda T, Kino-Oka M. Large-scale culture of a megakaryocytic progenitor cell line with a single-use bioreactor system. *Biotechnol Progr* 2018;34(2):362–9.
- [84] Grimm D, Egli M, Krüger M, Riwaldt S, Corydon TJ, Kopp S, et al. Tissue engineering under microgravity conditions—use of stem cells and specialized cells. *Stem Cells Dev* 2018;27(12):787–804.
- [85] Wang X, Wei G, Yu W, Zhao Y, Yu X, Ma X. Scalable producing embryoid bodies by rotary cell culture system and constructing engineered cardiac tissue with ES-derived cardiomyocytes *in vitro*. *Biotechnol Progr* 2006;22(3):811–8.
- [86] Jha R, Wu Q, Singh M, Preininger MK, Han P, Ding G, et al. Simulated microgravity and 3D culture enhance induction, viability, proliferation and differentiation of cardiac progenitors from human pluripotent stem cells. *Sci Rep* 2016;6(1):30956.
- [87] Yuge L, Kajiume T, Tahara H, Kawahara Y, Umeda C, Yoshimoto R, et al. Microgravity potentiates stem cell proliferation while sustaining the capability of differentiation. *Stem Cells Dev* 2006;15(6):921–9.
- [88] Leung HW, Chen A, Choo ABH, Reuveny S, Oh SKW. Agitation can induce differentiation of human pluripotent stem cells in microcarrier cultures. *Tissue Eng Part C Methods* 2011;17(2):165–72.
- [89] Hang H, Guo Y, Liu J, Bai L, Xia J, Guo M, et al. Computational fluid dynamics modeling of an inverted frustoconical shaking bioreactor for mammalian cell suspension culture. *Biotechnol Bioeng* 2011;106(3):567–75.
- [90] Zhu L, Monteil DT, Wang Y, Song B, Hacker DL, Wurm MJ, et al. Fluid dynamics of flow fields in a disposable 600-mL orbitally shaken bioreactor. *Biomam Eng J* 2018;129:84–95.
- [91] Yamamoto T, Yano M, Okano Y, Kino-oka M. Numerical investigation for the movement of cell colonies in bioreactors: stirring and orbital shaking tanks. *J Chem Eng Jpn* 2018;51(5):423–30.
- [92] Chen AKL, Chen X, Choo ABH, Reuveny S, Oh SKW. Critical microcarrier properties affecting the expansion of undifferentiated human embryonic stem cells. *Stem Cell Res* 2011;7(2):97–111.
- [93] Park Y, Chen Y, Ordovas L, Verfaillie CM. Hepatic differentiation of human embryonic stem cells on microcarriers. *J Biotechnol* 2014;174:39–48.
- [94] Rodrigues AL, Rodrigues CAV, Gomes AR, Vieira SF, Badenes SM, Diogo MM,

- et al. Dissolvable microcarriers allow scalable expansion and harvesting of human induced pluripotent stem cells under xeno-free conditions. *Biotechnol J* 2019;14(4):e1800461.
- [95] Li Y, Jiang X, Li L, Chen ZN, Gao G, Yao R, et al. 3D printing human induced pluripotent stem cells with novel hydroxypropyl chitin bioink: scalable expansion and uniform aggregation. *Biofabrication* 2018;10(4):044101.
- [96] Horiguchi I, Chowdhury MM, Sakai Y, Tabata Y. Proliferation, morphology, and pluripotency of mouse induced pluripotent stem cells in three different types of alginate beads for mass production. *Biotechnol Progr* 2014;30(4):896–904.
- [97] Horiguchi I, Sakai Y. Alginate encapsulation of pluripotent stem cells using a co-axial nozzle. *J Vis Exp* 2015;101:e52835.
- [98] Tabata Y, Horiguchi I, Lutolf MP, Sakai Y. Development of bioactive hydrogel capsules for the 3D expansion of pluripotent stem cells in bioreactors. *Biomater Sci* 2014;2(2):176–83.
- [99] Dang SM, Gerecht-Nir S, Chen J, Itskovitz-Eldor J, Zandstra PW. Controlled, scalable embryonic stem cell differentiation culture. *Stem Cells* 2004;22(3):275–82.
- [100] Gerecht S, Burdick JA, Ferreira LS, Townsend SA, Langer R, Vunjak-Novakovic G. Hyaluronic acid hydrogel for controlled self-renewal and differentiation of human embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007;104(27):11298–303.
- [101] Wilson JL, Najia MA, Saeed R, McDevitt TC. Alginate encapsulation parameters influence the differentiation of microencapsulated embryonic stem cell aggregates. *Biotechnol Bioeng* 2014;111(3):618–31.
- [102] Kagihiro M, Fukumori K, Aoki T, Ungkulpasvich U, Mizutani M, Viravaidya-Pasuwat K, et al. Kinetic analysis of cell decay during the filling process: application to lot size determination in manufacturing systems for human induced pluripotent and mesenchymal stem cells. *Biochem Eng J* 2018;131:31–8.
- [103] Giugliarelli A, Urbanelli L, Ricci M, Paolantoni M, Emiliani C, Saccardi R, et al. Evidence of DMSO-induced protein aggregation in cells. *J Phys Chem A* 2016;120(27):5065–70.
- [104] Yuan C, Gao J, Guo J, Bai L, Marshall C, Cai Z, et al. Dimethyl sulfoxide damages mitochondrial integrity and membrane potential in cultured astrocytes. *PLoS ONE* 2014;9(9):e107447.
- [105] Katkov II, Kim MS, Bajpai R, Altman YS, Mercola M, Loring JF, et al. Cryopreservation by slow cooling with DMSO diminished production of Oct-4 pluripotency marker in human embryonic stem cells. *Cryobiology* 2006;53(2):194–205.
- [106] Czysk K, Minger S, Thomas N. DMSO efficiently down regulates pluripotency genes in human embryonic stem cells during definitive endoderm derivation and increases the proficiency of hepatic differentiation. *PLoS ONE* 2015;10(2):e0117689.
- [107] Nishigaki T, Teramura Y, Nasu A, Takada K, Toguchida J, Iwata H. Highly efficient cryopreservation of human induced pluripotent stem cells using a dimethyl sulfoxide-free solution. *Int J Dev Biol* 2011;55(3):305–11.
- [108] Katkov II, Kan NG, Cimadamore F, Nelson B, Snyder EY, Terskikh AV. DMSO-free programmed cryopreservation of fully dissociated and adherent human induced pluripotent stem cells. *Stem Cells Int* 2011;2011:981606.
- [109] Matsumura K, Kawamoto K, Takeuchi M, Yoshimura S, Tanaka D, Hyon SH. Cryopreservation of a two-dimensional monolayer using a slow vitrification method with polyampholyte to inhibit ice crystal formation. *ACS Biomater Sci Eng* 2016;2(6):1023–9.
- [110] Heng BC, Bested SM, Chan SH, Cao T. A proposed design for the cryopreservation of intact and adherent human embryonic stem cell colonies. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 2005;41(3–4):77–9.
- [111] Ha SY, Jee BC, Suh CS, Kim HS, Oh SK, Kim SH, et al. Cryopreservation of human embryonic stem cells without the use of a programmable freezer. *Hum Reprod* 2005;20(7):1779–85.
- [112] Li X, Krawetz R, Liu S, Meng G, Rancourt DE. ROCK inhibitor improves survival of cryopreserved serum/feeder-free single human embryonic stem cells. *Hum Reprod* 2009;24(3):580–9.
- [113] Xu X, Cowley S, Flaim CJ, James W, Seymour LW, Cui Z. Enhancement of cell recovery for dissociated human embryonic stem cells after cryopreservation. *Biotechnol Progr* 2010;26(3):781–8.
- [114] Li R, Yu G, Azarin SM, Hubel A. Freezing responses in DMSO-based cryopreservation of human iPS cells: aggregates versus single cells. *Tissue Eng Part C Methods* 2018;24(5):289–99.
- [115] Mazur P. Freezing of living cells: mechanisms and implications. *Am J Physiol* 1984;247(3 Pt 1):C125–42.
- [116] Baust JM, Campbell LH, Harbell JW. Best practices for cryopreserving, thawing, recovering, and assessing cells. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 2017;53(10):855–71.
- [117] Yang PF, Hua TC, Wu J, Chang ZH, Tsung HC, Cao YL. Cryopreservation of human embryonic stem cells: a protocol by programmed cooling. *Cryo Lett* 2006;27(6):361–8.
- [118] Yuan Y, Yang Y, Tian Y, Park J, Dai A, Roberts RM, et al. Efficient long-term cryopreservation of pluripotent stem cells at -80°C . *Sci Rep* 2016;6(1):34476.
- [119] Berendsen TA, Bruinsma BG, Puts CF, Saeidi N, Usta OB, Uygun BE, et al. Supercooling enables long-term transplantation survival following 4 days of liver preservation. *Nat Med* 2014;20(7):790–3.
- [120] Huang H, Yarmush ML, Usta OB. Long-term deep-supercooling of large-volume water and red cell suspensions via surface sealing with immiscible liquids. *Nat Commun* 2018;9(1):3201.
- [121] Massie I, Selden C, Hodgson H, Fuller B. Storage temperatures for cold-chain delivery in cell therapy: a study of alginate-encapsulated liver cell spheroids stored at -80°C or -170°C for up to 1 year. *Tissue Eng Part C Methods* 2013;19(3):189–95.
- [122] Pogozhykh D, Pogozhykh O, Prokopyuk V, Kuleshova L, Goltsev A, Blasczyk R, et al. Influence of temperature fluctuations during cryopreservation on vital parameters, differentiation potential, and transgene expression of placental multipotent stromal cells. *Stem Cell Res Ther* 2017;8(1):66.
- [123] Merkle FT, Ghosh S, Kamitaki N, Mitchell J, Avior Y, Mello C, et al. Human pluripotent stem cells recurrently acquire and expand dominant negative P53 mutations. *Nature* 2017;545(7653):229–33.
- [124] Ben-David U, Siranosian B, Ha G, Tang H, Oren Y, Hinohara K, et al. Genetic and transcriptional evolution alters cancer cell line drug response. *Nature* 2018;560(7718):325–30.
- [125] Liu Y, Mi Y, Mueller T, Kreibich S, Williams EG, Van Drogen A, et al. Multiomic measurements of heterogeneity in HeLa cells across laboratories. *Nat Biotechnol* 2019;37(3):314–22.
- [126] Sekimoto A, Kanemaru Y, Okano Y, Kanie K, Kato R, Kino-oka M. Numerical investigation of particle dispersion in the preprocessing stage for a static cell cultivation. *Regen Ther* 2019;12:83–7.
- [127] Tang B, Pan Z, Yin K, Khateeb A. Recent advances of deep learning in bioinformatics and computational biology. *Front Genet* 2019;10:214.
- [128] Ching T, Himmelstein DS, Beaulieu-Jones BK, Kalinin AA, Do BT, Way GP, et al. Opportunities and obstacles for deep learning in biology and medicine. *J R Soc Interface* 2018;15(141):20170387.